doi 10.3969/j.issn.1674-4500.2016.03.30
分子影像学杂志2016年第39卷第3期

基础研究

5-FU致小鼠肠黏膜严重损伤时β-catenin的表达及其意义

罗育其[1],于海涛[1],区文弢[1],董 栋[1],吴承堂[2]
[1]广州市第一人民医院南沙医院普通外科,广东 广州 511457;[2]南方医科大学南方医院普通外科,广东 广州 510515

摘要:目的 探讨与肠上皮干细胞增殖关系密切β-catenin蛋白在5-FU致小鼠肠黏膜严重损伤时的表达及其意义。**方法** 取成年C57/BL小鼠70只,采用随机数字法将小鼠随机分为对照组(30只)和实验组(40只)。实验组予腹腔注射大剂量5-FU [150 mg/(kg·d)×5 d],分别于注射后1、3、5 d每天剖杀10只小鼠,取所有小鼠中段小肠组织固定,进行常规病理组织学检查及免疫化检查肠黏膜中β-catenin蛋白表达情况;对照组腹腔注射等体积的生理盐水,连续注射5 d,处理方法和检测指标与实验组相同。**结果** 大剂量5-FU作用后,小鼠肠组织受到严重损伤,黏膜炎症、水肿,肠绒毛脱落及肠隐窝消失,随着时间推移,肠黏膜有少量修复;与对照组比较,实验组肠组织β-catenin蛋白表达水平显著增加,随着时间推移,β-catenin蛋白表达阳性的细胞比例逐渐下降。**结论** 肠黏膜受到损伤后,β-catenin表达增加,促进肠上皮干细胞增殖,完成对肠黏膜的损伤修复。
关键词:β-catenin;5-FU;肠上皮干细胞;肠黏膜

Expression of β-catenin in mouse intestinal mucosa siverely dameged by 5-FU

LUO Yuqi[1], YU Haitao[1], OU Wentao[1], DONG Dong[1], WU Chengtang[2]
[1]Department of General Surgery, Nansha Hospital, Guangzhou First People's Hospital, Guangzhou 510180, China; [2]Department of General Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical Univercity, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To discuss the expression of β-catenin proten and its significance in mouse intestinal mucosa, and β-catenin was colse related to the proliferation of intestinal stem cells. **Methods** A total of 70 C57/BL mice were divided two goups randomly, 30 of them were in control group (group A), and other 40 mice were in experimental group. The mice in experimental group were treated with introperitoneal injection of large dose of 5-FU (150 mg/kg body weight for 5 consecutive days), the 30 mice were divied 3 groups, 10 of them were kill at the 1st the 3rd day and the 5th day after the injection was finished. The middle of intestine from these mice was fixed for HE straining and immunohistochemical techniques. The experession of β-catenin in the intestinal sample was detected by immunohistochemical techniques.The mice in control group were introperitoneal injected saline for five days as control, and them were treated as the mice in experimental group. **Results** After injectin hight dose of 5-FU, the intestine of the mice suffered severe damage: the mucosa was shown as inflammatory oedema, the villi and cryptes disappared, and the mucosa repaired minimally with time. The expression of β-catenin proten in intestianl mucosa of the mice after injecting hight dose of 5-FU increased significantly comparied with control the mice in control group, and percentage of β-catenin proten positive cells in intestinal mucosa gradually decreased with time in mice of experimental group. **Conclusion** The expression of β-catenin in intestinal mucosa increased when the mice were injected hight dose of 5-FU, meaning the proten could promote the proliferation of intestinal stem cells and finish the regeneration of intestinal mucosa.
Key words: β-catenin; 5-FU; intestinal stem cells; intestinal mucosa

肠黏膜由吸收细胞、杯状细胞、番氏细胞及内分泌等细胞组成,发挥着营养吸收、肠屏障及免疫等功能作用。肠黏膜细胞更新速度迅速,每3~4 d即可完成细胞的更新,位于肠隐窝底部的肠上皮干细胞是肠黏膜不断更新的原动力,肠黏膜的各种功能细胞都是由肠上皮干细胞分裂、分化而来[1]。5-FU是一种细胞周期依赖化疗药物,主要作用于分裂期细胞。肠黏膜细胞作为快速更新细胞,处于分裂期细胞比例较大,亦为5-FU作用的靶细胞。前期实验已证实,肠上皮干细胞作为相对静止期细胞,5-FU对其损伤作用不明显,因此亦是肠黏膜损伤修复的原动力[2]。β-catenin是Wnt通路的核心蛋白,在调节细胞分裂、分化过程中起着重要作用[3]。因此,本研究将制备大剂量5-FU对肠黏膜严重损伤模型,探讨此时β-catenin的表达变化及其意义。

收稿日期:2016-05-17
基金项目:广州市医药卫生科技项目(2014A010009);广东省中医强省科研项目(20152040)
作者简介:罗育其,博士,副主任医师,E-mail: henry216@fimmu.com

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

成年C57/BL小鼠70只,购于南方医科大学实验动物中心,雌雄不拘,体质量24±3 g,采用随机数字法将小鼠随机分为实验组(40只)和对照组(30只),实验组予

腹腔注射大剂量5-FU[150 mg/(kg.d)]，连续注射5 d，对照组予腹腔注射等体积的生理盐水。两组小鼠均在注射结束后第1、3 、5 天处死取材，每天处死10只。剩余10只小鼠为备用，补充实验过程中的死亡小鼠，最终使各个时间点剖杀的小鼠数量均为10只。

1.2 取材及标本处里

对照组小鼠于第5天注射结束后剖杀，取出中段小肠组织，长约2 cm，清洗肠腔后4%多聚甲醛固定；实验组在上述时间点剖杀处死小鼠，同样取出中段小肠组织，长约2 cm，清洗肠腔后4%多聚甲醛固定。所有标本固定后将用于常规HE染色和免疫组化检测。

1.3 免疫组化检测肠黏膜β-catenin蛋白表达情况

切片常规脱蜡入水后，磷酸盐缓冲液冲洗3次，每次5 min。每张切片加50:1过氧化物阻断溶液，室温孵育10 min，PBS冲洗3次，微波抗原修复30 min，加BSA封闭液，室温孵育l0 min；加入一抗兔抗大鼠β-catenin抗体，4 ℃过夜，PBS洗涤3次后，加入而二抗生物素标记山羊抗兔IgG抗体，4 ℃过夜，PBS洗涤3次后，ABC法染色。结果判定，细胞浆着色判定为β-catenin阳性细胞，在400倍视野下，每张切片随机挑选5个视野，计数阳性细胞数，β-catenin阳性细胞比例=β-catenin阳性细胞/镜下细胞总数。

1.4 统计方法

实验数据均数±标准差表示，采用SPSS20.0统计分析软件进行统计分析，组间比较采用LSD-*t* 检验，$P<0.05$认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠一般状况

对照组小鼠状态良好，实验过程中无死亡。实验组小鼠一般状况较差，表现为进食量及活动量减少、出现严重腹泻及体质量下降；实验过程中，注射结束后第1天有1只小鼠死亡，第3天有3只小鼠死亡，第5天有3只死亡，所有死亡的小鼠由后备小鼠补充，使各时间点剖杀小鼠数量均为10只。

2.2 病理组织改变

对照组小鼠肠组织结构正常，肠黏膜绒毛排列整齐、规律，肠隐窝深浅均匀。而实验组肠组织受到严重损伤，肉眼可见肠壁变薄，肠腔积液；镜下观察可见注射大剂量5-FU后小鼠肠组织肌层萎缩，肠绒毛、隐窝结构消失，肠腔覆盖一层单层上皮细胞。处理后第3天小鼠肠上皮开始修复，隐窝结构开始形成，绒毛结构仍未形成。处理后第5天小鼠肠黏膜进一步修复，可见短而粗的肠绒毛形成(图1)。







图1 小鼠肠黏膜组织学改变(原放大倍数: ×400)

A: 对照组小肠组织; ***B***: 为实验组处理后1 d小肠组织; ***C***: 为实验组处理后第5 天小肠组织.

2.3 β-catenin蛋白表达情况

对照组β-catenin蛋白主要表达于肠隐窝中上2/3位置，肠绒毛部分几乎不表达β-catenin蛋白；受到大剂量5-FU作用后，B组小鼠肠腔中的单层上皮细胞几乎都表达β-catenin蛋白，随着损伤修复的进行，β-catenin蛋白逐渐往隐窝方向集中(图2)。与对照组比较，各组小鼠肠黏膜细胞β-catenin蛋白表达阳性率均有统计学差异($P<0.01$，表1)。

3 讨论

肠黏膜保持旺盛的自我更新能力，有研究表明，每3~4 d全部肠黏膜功能细胞完成一次更新，位于肠隐窝底部的肠上皮干细胞是肠黏膜自我更新的原动力，肠上皮干细胞通过不对称分裂产生一个肠上皮干细胞及过度细胞(TA)，TA不断分裂、分化，最终产生各种功能细胞，位于肠绒毛的各种功能细胞不断凋亡、脱离，新生细胞不断从肠隐窝往肠绒毛方向将脱离细胞替代[4]。5-FU即氟尿嘧啶，是一种细胞周期依赖化疗药物，主要作用于快速分裂期细胞，为结肠癌化疗首选药物之一，而化疗过程中，患者常出现腹泻，严重者可发生伪膜性肠炎，表明5-FU对肠黏膜损伤作用明显。前期实验表明，肠隐窝中上2/3位置细胞表达丰富的PCNA，而“干细胞区”的PCNA表达较弱，表明肠黏膜中TA保持旺盛的分裂能力，是5-FU杀伤的主要对象，TA受损后，导致

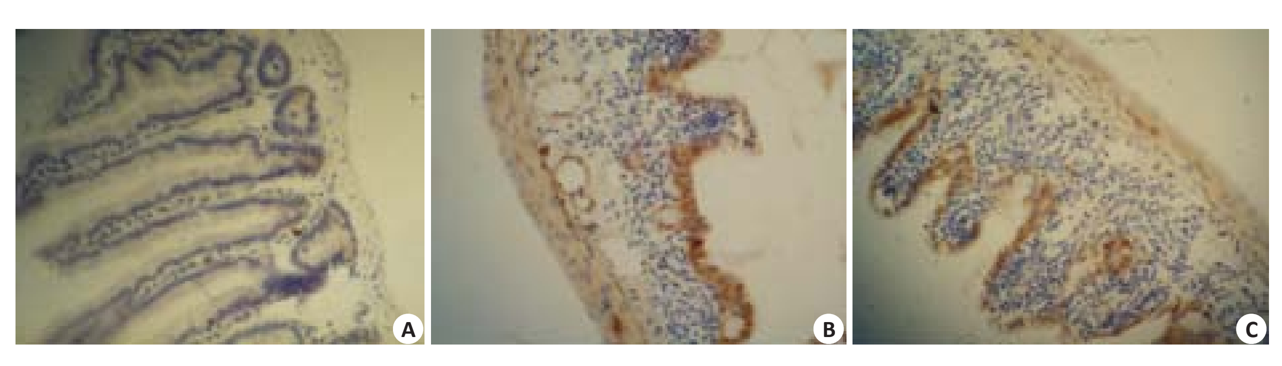


图2 免疫组化β-catenin表达情况(原放大倍数: ×400)
A: 对照组小肠组织; ***B***: 为实验组处理后1 d小肠组织; ***C***: 为实验组处理后第5天小肠组织.

表1 各个时间点实验组与对照组肠年黏膜细胞β-catenin蛋白表达阳性率(n=10)

组别	处理后1 d(%)	处理后3 d(%)	处理后5 d(%)
对照组	2.52±0.45	2.47±0.52	2.55±0.56
实验组	67.34±3.45	52.56±4.74	47.35±0.67
t值	92.56	81.21	76.45
P值	<0.01	<0.01	<0.01

肠绒毛各种功能细胞无法补充,最终导致肠绒毛脱落[5-6]。本研究常规病理证实改变进一步证实了上述观点,大剂量5-FU作用后,肠绒毛脱落,肠腔只剩下一单层上皮细胞覆盖,前期实验亦证实,这些单层上皮细胞几乎都表达肠上皮干细胞标志物—musashi-1(msi-1),表明这些单层上皮细胞含有丰富的肠上皮干细胞,发挥着肠黏膜损伤修复作用[6]。随着修复的进行,肠隐窝逐渐形成,肠上皮干细胞逐渐往肠隐窝聚集,并逐渐分裂、分化出各种功能细胞,逐渐形成粗短的肠绒毛。

肠上皮干细胞的分裂、分化受到一系列复杂的细胞信号通路调节。β-catenin是一种胞内糖蛋白,为Wnt/β-catenin信号通路核心蛋白,越来越多证据表明,该通路在维持干细胞稳定及自我更新方面起着重要作用[7]。经典Wnt/β-catenin信号通路Wnt受体主要为Frizzled或低密度脂蛋白受体相关蛋白5/6(LRP5/6)。Wnt与细胞受结合后,使LRP5/6磷酸化,磷酸化的LRP5/6与Axin结合,后者可使β-catenin从结合体变成游离体,游离的β-catenin进入细胞核,结合TCF转录因子,最终使Wnt的目标基因得到表达。即细胞核内,形成β-catenin/Tcf4复合体,直接上调c-Myc基因的表达,使细胞进入分裂周期[8-9]。本实验亦证实,在正常对照组肠黏膜中,β-catenin主要表达于肠隐窝中上2/3位置,即TA的位置,表明这部分细胞处于旺盛的分裂期。肠黏膜受到损伤后,肠上皮干细胞启动Wnt/β-catenin信号通路,对损伤进行修复。从本实验可以发现,当肠黏膜受到大剂量5-FU作用后,注射5-FU完成后第1天剖杀的小鼠小肠肠腔中的单层上皮细胞几乎都表达β-catenin蛋白,前期实验证实这部分细胞亦表达msi-1,表明肠上皮干细胞启动细胞分裂周期,以修复损伤的肠黏膜,随着修复的进行,β-catenin蛋白的表达主要位于新生肠隐窝中,且比例逐渐降低,表明终末功能细胞不断生成,干细胞比例亦随之降低,最终完成对肠黏膜的重塑。

本实验证实了在肠黏膜受到大剂量5-FU损伤后,β-catenin蛋白在肠黏膜中表达显著升高,表明其在肠黏膜损伤修复过程中的重要作用,但其调控肠上皮干细胞分裂、分化的机制仍有待进一步研究。

参考文献:

[1] Dorfman T, Pollak Y, Sohotnik R, et al. Enhanced intestinal epithelial cell proliferation in diabetic rats correlates with β-catenin accumulation[J]. J Endocrinol, 2015, 226(3): 135-43.

[2] Lien WH, Fuchs E. Wnt some lose some: transcriptional governance of stem cells by Wnt/β-catenin signaling[J]. Genes Dev, 2014, 28 (14): 1517-32.

[3] Zani A, Cananzi M, Fascetti-Leon F, et al. Amniotic fluid stem cells improve survival and enhance repair of damaged intestine in necrotising enterocolitis via a COX-2 dependent mechanism[J]. Gut, 2014, 63(2): 300-9.

[4] 罗育其, 吴承堂, 闻 英, 等. 大剂量5-FU致肠黏膜严重损伤时肠上皮msi-1的表达及其意义[J]. 中华普通外科杂志, 2007, 22(12): 939-42.

[5] Ogaki S, Shiraki N, Kume K, et al. Wnt and notch signals guide embryonic stem cell differentiation into the intestinal lineages[J]. Stem Cells, 2013, 31(6): 1086-96.

[6] 罗育其, 吴承堂, 闻 英, 等. 大剂量5-FU致肠黏膜严重损伤时PCNA的表达[J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(12): 1860-2.

[7] Krausova M, Korinek V. Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer[J]. Cell Signal, 2014, 26(3): 570-9.

[8] Chen Y, Lee SH, Tsai YH, et al. Ischemic preconditioning increased the intestinal stem cell activities in the intestinal crypts in mice[J]. J Surg Res, 2014, 187(1): 85-93.

[9] Sancho R, Cremona CA, Behrens A. Stem cell and progenitor fate in the mammalian intestine: Notch and lateral inhibition in homeostasis and disease[J]. EMBO Rep, 2015, 16(5): 571-81.